

Воздействие рапамицина на гибель сердечных миофибробластов, индуцированную стауроспорином

К. В. Дергилев^{1*}, З. И. Цоколаева^{1,2}, А. А. Долгодворова¹, Е. В. Парфенова¹

¹ Лаборатория ангиогенеза, Институт экспериментальной кардиологии Национального медицинского исследовательского центра кардиологии им. акад. Е. И. Чазова Минздрава России, Россия, 121552, г. Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15а

² НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского Федерального научно-клинического центра реаниматологии и реабилитологии Минобрнауки России, Россия, 107031, г. Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2

Для цитирования: К. В. Дергилев, И. Цоколаев, А. А. Долгодворова, Е. В. Парфенова. Воздействие рапамицина на гибель сердечных миофибробластов, индуцированную стауроспорином. *Общая реаниматология*. 2025; 21 (6): 45–53. <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2025-6-2593> [На русск. и англ.]

*Адрес для корреспонденции: Константин Владимирович Дергилев, doctorkote@gmail.com

Резюме

Многие заболевания сердца связаны с избыточным накоплением миофибробластов, характеризующихся повышенной продукцией белков внеклеточного матрикса, устойчивостью к апоптозу, что ведет к прогрессированию фиброза и сердечной дисфункции. Воздействие на механизмы элиминации миофибробластов является перспективной стратегией лечения фиброза, требующей изучения.

Цель работы: определить способность рапамицина, соединения-активатора аутофагии, воздействовать на стауроспорин-индуцированную гибель сердечных миофибробластов.

Материалы и методы. Моделирование сердечного фиброза *in vivo* проводили с использованием модели перевязки дуги аорты у мыши. В исследованиях *in vitro* использовали миофибробласты, полученные путем дифференцировки фибробластов сердца под действием TGFβ1. Для изучения механизма элиминации миофибробластов разработали клеточную модель с использованием стауроспорина — алкалоида, который способен инициировать апоптоз в культуре сердечных миофибробластов. Исследование активности апоптоза и аутофагии выполняли с помощью иммунофлуоресцентных методов окрашивания, иммуноблоттинга и проточной цитометрии.

Результаты. Показали, что перегрузка сердца давлением вызывает накопление миофибробластов, характеризующихся низким показателем апоптоза (аннексин V+ клеток в ложнооперированных сердцах и после моделирования перегрузки давлением ($0,0016 \pm 0,0006\%$ и $0,0019 \pm 0,0009\%$; $p=0,32$, $n=10$), и развитием выраженного интерстициального фиброза в миокарде. Обнаружили, что рапамицин способен усиливать эффект стауроспорина и вызывать повышенную гибель миофибробластов за счет аутофагия-ассоциированных механизмов (контроль $1,68 \pm 0,66\%$ ($n=4$); стауроспорин $65,8 \pm 2,63\%$ ($n=4$); рапамицин + стауроспорин $73,73 \pm 0,67\%$ ($n=4$); контроль vs стауроспорин $p < 0,0001$; контроль vs рапамицин + стауроспорин $p < 0,0001$; стауроспорин vs рапамицин+стауроспорин $p=0,0071$).

Закключение. Рапамицин усиливал апоптоз миофибробластов, индуцированный воздействием стауроспорина, что может быть связано с регуляцией mTOR сигнализации и повышением активности аутофагии. Молекулярные механизмы этого процесса требуют дополнительных исследований.

Ключевые слова: сердечные миофибробласты; рапамицин; стауроспорин; сердечный фиброз; аутофагия

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование поддержано грантом Российского научного фонда № 23-15-00540, <https://rscf.ru/project/23-15-00540>.

Effect of Rapamycin on Staurosporine-Induced Cardiac Myofibroblast Death

Konstantin V. Dergilev^{1*}, Zoya I. Tsokolaeva^{1,2}, A. Dolgodvorova¹, Elena V. Parfenova¹

¹ Laboratory of Angiogenesis, Experimental Cardiology Institute, Acad. Chazov National Medical Research Center for Cardiology, Ministry of Health of Russia, 15a Cherepkovskaya 3rd Str., 121552 Moscow, Russia

² V.A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology, Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology, 25 Petrovka Str., Bldg. 2, 107031 Moscow, Russia

Summary

Many cardiac diseases are associated with an excessive accumulation of myofibroblasts, characterized by increased production of extracellular matrix proteins and resistance to apoptosis, which leads to progression of fibrosis and cardiac dysfunction. Targeting the mechanisms of myofibroblast elimination is a promising strategy for treating fibrosis that requires further investigation.

The aim of this work was to determine the ability of the autophagy activator rapamycin to affect the staurosporin-induced death of cardiac myofibroblasts.

Materials and methods. *In vivo* modeling of cardiac fibrosis was performed using a mouse model of aortic arch ligation. *In vitro* studies used myofibroblasts obtained by differentiation of cardiac fibroblasts in presence of transforming growth factor beta 1 (TGFβ1). To study the mechanism of myofibroblasts elimination, a cell model was developed using staurosporine, an alkaloid that can initiate apoptosis in a culture of cardiac myofibroblasts. The activity of apoptosis and autophagy was studied using immunofluorescence staining, immunoblotting, and flow cytometry.

Results. It was shown that pressure-induced cardiac overload causes the accumulation of myofibroblasts characterized by a low rate of apoptosis (annexin V+ cells in sham-operated hearts and after modeling pressure overload ($0.0016 \pm 0.0006\%$ and $0.0019 \pm 0.0009\%$; $p = 0.32$, $n = 10$), leading to marked interstitial fibrosis in the myocardium. It was found that rapamycin is able to enhance the effect of staurosporin and cause increased myofibroblast death due to autophagy-associated mechanisms (control $1.68 \pm 0.66\%$ ($n = 4$); staurosporin $65.8 \pm 2.63\%$ ($n = 4$); rapamycin + staurosporin $73.73 \pm 0.67\%$ ($n = 4$); control vs staurosporin $p < 0.0001$; control vs rapamycin + staurosporin $p < 0.0001$; staurosporin vs rapamycin + staurosporin $p = 0.0071$).

Conclusion. Rapamycin enhanced myofibroblast apoptosis induced by staurosporine, which may be related to regulation of the mTOR signaling and increased autophagy activity. The molecular mechanisms of this process require further research.

Keywords: *cardiac myofibroblasts; rapamycin; staurosporine; cardiac fibrosis; autophagy*

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. This study was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 23-15-00540). <https://rscf.ru/project/23-15-00540>.

Информация об авторах/Information about the authors:

Константин Владимирович Дергилев/Konstantin V. Dergilev: <https://orcid.org/0000-0003-2712-4997>

Зоя Ивановна Цоколаева/Zoya I. Tsokolaeva: <https://orcid.org/0000-0003-2441-6062>

Алерия Альбертовна Долгодворова/Aleria A. Dolgodvorova: <https://orcid.org/0000-0003-2460-088X>

Елена Викторовна Парфенова/Elena V. Parfenova: <https://orcid.org/0000-0002-0969-5780>

Read the full-text English version at www.reanimatology.com

Введение

Сердечный фиброз является важной составляющей патогенеза большинства сердечно-сосудистых заболеваний, включая инфаркт миокарда, хроническую сердечную недостаточность, кардиомиопатии, гипертоническую болезнь, и является нерешенной проблемой здравоохранения ведущих стран мира [1, 2]. Фиброз характеризуется избыточным отложением белков внеклеточного матрикса в интерстиции, что ведет к существенной перестройке сердечного микроокружения, увеличению жесткости сердечной стенки и необратимому нарушению систолической функции сердца.

Наряду с этим, нарушение нативной структуры миокарда создает идеальную «почву» для возникновения желудочковых нарушений ритма, приводящих к внезапной сердечной смерти, а также ускоряет прогрессирование сердечных заболеваний [3–5]. Результаты многочисленных научных исследований позволяют рассматривать фибробласты/миофибробласты как основную патологическую детерминанту развития заболеваний, ассоциированных с фиброзом [6].

Хорошо известно, что фибробласты являются важнейшими регуляторами сердечного микроокружения, обеспечивающего регуляцию синтеза/деградации коллагенов, реализацию электромеханического сопряжения, быстрого ответа на повреждение (например, укрепление инфицированной сердечной стенки для предотвращения ее разрыва) и обмен секреторными сиг-

налами [7–9]. Между тем, нарушение механизмов элиминации фибробластов, которые реализуются за счет их апоптоза, запускает «порочный круг» активации фибробластов, что ведет к их дифференцировке в направлении миофибробластов, избыточному накоплению в ткани сердца, чрезмерному отложению матрикса и развитию патологии [10]. Это определяет высокую актуальность исследований, направленных на изучение молекулярных механизмов регуляции пула миофибробластов и поиск соединений, которые обладают способностью индуцировать элиминацию миофибробластов, что является основной стратегией борьбы с прогрессированием фиброза.

Особый интерес представляют соединения-модуляторы аутофагии — эволюционно-консервативного механизма поддержания клеточного гомеостаза, за счет утилизации макромолекул и органелл через лизосомальный путь деградации [11–12]. Недавние исследования нашей и других научных групп показали, что многие заболевания, ассоциированные с фиброзом, характеризуются снижением активности аутофагии как в отдельных субпопуляциях фибробластов/миофибробластов, так и в других клетках сердечного микроокружения [12, 13]. Следовательно, повышение активности аутофагии в физиологических пределах может быть потенциальной стратегией воздействия на функции миофибробластов и механизмы развития фиброза в целом.

Цель работы — определить способность рапамицина, соединения-активатора аутофагии,

воздействовать на стауроспорин-индуцированную гибель сердечных миофибробластов.

Материал и методы

Животные. Все манипуляции с животными были одобрены Этическим комитетом института экспериментальной кардиологии Национального медицинского исследовательского центра кардиологии им. ак. Е. И. Чазова (разрешение № LA/28.07.2023 от 28 июля 2023 г.; № LA/26.09.2023 от 28 сентября 2023 г.) и проводили с учетом действующих международных норм. Исследования проводили на мышах-самцах C57BL/6J массой 20–23 г. На протяжении всех экспериментов мышей содержали при температуре 24°C с 12-часовым циклом день-ночь и обеспечением свободного доступа к пище и воде. Эвтаназию животных проводили путем наркотизации Изофлюраном с последующей дислокацией шейного отдела позвоночника.

Моделирование поперечного сужения аорты. Животных разделили на две группы: 1) ложнооперированные животные ($n=10$); 2) животные с моделированием поперечного сужения аорты (ПСА) ($n=72$). Для наркотизации животных использовали трибромэтанол (авертин, интраперитонеально; 100 мкл/кг). Для моделирования ПСА обеспечивали доступ в грудную полость через верхнюю срединную стернотомию. В операционном поле проводили дислокацию тимуса, мышц шеи для формирования доступа к дуге аорты и заводили шовную нить 6,0 под аортой между местами отхождения брахиоцефальной и левой общей сонной артерий. Далее, изогнутую иглу 27G размещали на дуге аорты, поверх которой завязывали лигатуру. После затягивания лигатуры (вокруг иглы и аорты) иглу быстро удаляли. Контрольным мышам выполняли идентичную процедуру без наложения лигатуры на дугу аорты (ложнооперированные животные). После проведения манипуляции проводили послышное ушивание раны. Для послеоперационного обезболивания использовали Panadol сироп *per os*; 5 дней. Эвтаназию животных проводили через 30 дней после манипуляции.

Анализ криосрезов сердца после моделирования ПСА. Для проведения гистологических исследований сердца мышей извлекали, промывали физиологическим раствором, заключали в среду Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek), замораживали в парах жидкого азота и использовали для подготовки криосрезов. Изготавливали криосрезы толщиной 7 мкм на криостате Leica CM1900, помещали на предметные стекла и хранили при -70°C .

Окрашивание срезов сердец пикросириусом красным (Picrosirius red) для визуализации коллагенов проводили в соответствии с ранее описанными протоколами [14–16]. Срезы промывали дистиллированной водой и помещали в горячий раствор красителя на 10 мин. Далее, срезы промывали 3 раза 5% раствором уксусной кислоты. После окрашивания слайды промывали дистиллированной водой, обез-

живали и монтировали, используя среду на основе ксилола. Окрашенные препараты исследовали с помощью стандартной световой и поляризационной микроскопии, документирование изображений выполняли с помощью прибора Leica Aperio CS2 («Leica»). Морфометрический анализ проводили путем измерения размеров кардиомиоцитов с помощью программы Image J (NIH, США).

Оценка экспрессии белков-регуляторов аутофагии методом иммуноблоттинга. Для анализа уровня аутофагии использовали образцы сердечной ткани левого желудочка контрольных животных и мышечей после моделирования ПСА. Белки лизатов разделяли методом ДСН-электрофореза в 10% полиакриламидном геле на приборе Mini-PROTEAN 2 («Bio-rad», США). Электроперенос осуществляли на ПВДФ-мембрану («Millipore», США) на приборе Trans-blott Turbo («Bio-rad», США). После электропереноса мембрану инкубировали в блокирующем буфере (фосфатно-солевой буфер, содержащий 5%-е сухое обезжиренное молоко («AppliChem», США). Далее мембраны инкубировали антителами против LC3 II/I (Abclonal, США), p62/SQSTM1 («Abclonal», США), активной формы каспазы 3 (cleaved caspase-3; «Cell signaling», США) и тубулина («Cell signaling», США) в течение 12 ч, $+4^{\circ}\text{C}$ при постоянном перемешивании. Затем мембраны отмывали 3 раза в ФСБ, содержащем 0,05% Tween-20 (каждая отмывка по 10 минут при постоянном перемешивании). После промывок мембраны инкубировали с вторичными антителами против иммуноглобулинов кролика, конъюгированными с пероксидазой хрена AffiniPure (H + L) («Jackson ImmunoResearch», США). Затем мембраны отмывали 3 раза по 10 мин каждый в фосфатно-солевом буфере, содержащем 0,05% Tween-20. Детекцию белков осуществляли с помощью хемилюминесцентного субстрата SuperSignal West Pico («Thermo Scientific», США). Сигнал фиксировали с помощью геле-документирующей системы Fusion-SL 3500.WL («Vilber Lourmat», Франция). Денситометрический анализ интенсивности свечения исследуемых белков проводили в программе Image J («National Institutes of Health», США).

Получение культуры миофибробластов сердца мышши. Ткань мышечных сердец (интактные сердца мышшей C57BL/6J; $n=160$) измельчали и ферментировали в растворе 0,1% коллагеназы II типа и 0,1% трипсина (10 раз по 10 мин при 37°C). Выделенные клетки ресуспендировали в модифицированной среде DMEM/F12, содержащей 10% фетальной сыворотки теленка и антибиотики. Через 120 мин флоатирующие клетки отмывали с помощью ФСБ, а адгезированные клетки использовали для наращивания в культуре в течение 3 дней. Далее, полученные клетки депривировали и стимулировали рекомбинантным TGF β 1 (5 нг/мл) в течение 4 дней для индукции дифференцировки фибробластов в направлении миофибробластов и получения культуры миофибробластов [17–19].

Детекция аутофагосом с помощью красителя Cyto-ID. Cyto-ID — краситель, который избирательно

детектирует аутофагосомы и минимально окрашивает лизосомы, что позволяет его использовать для специализированного мониторинга аутофагии [20]. Для визуализации везикул аутофагии использовали набор Cyto-ID® Green Detection Kit (Sigma, США). Миофибробласты сердца мыши (1×10^4) культивировали на стеклянных камерах-слайдах в отсутствие или в присутствии стауроспорина. Образец окрашивали реагентом Cyto-ID® в течение 30 мин при 37°C и анализировали с помощью Image Exfluorier («LCI», Южная Корея).

Оценка характеристик миофибробластов. Для проведения детекции специфических маркеров миофибробластов (коллагена, гладкомышечного альфа-актина) использовали иммуоцитохимию. Клетки культивировали в стерильных культуральных планшетах с ячейками, промывали и фиксировали 10 мин в 3,7% растворе формальдегида, приготовленного на фосфатно-солевом буфере (pH 7,3). Далее, клетки промывали 3 раза ФСБ, пермеабилizовали в 0,1% растворе Triton X100/ФСБ (10 минут) и после промывки ФСБ клетки инкубировали в «блокирующем» растворе, препятствующему неспецифическому связыванию II антител (1% раствор БСА/ФСБ, 10% сыворотки животного-донора II антител). Затем проводили окрашивание стекол первичными и II антителами, конъюгированными с Alexa Fluor 594 («Invitrogen», США). Ядра клеток окрашивали DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол). Для оценки цитоскелета использовали фаллоидин-Alexa594 (бициклический олигопептид, способный избирательно связываться с полимеризованным фибриллярным актином, входящим в состав цитоскелета).

Для оценки сократительного фенотипа миофибробластов использовали тест «сокращения коллагенового геля». В качестве геля-носителя использовали коллаген I (2,5 мг/мл). Коллагеновый гель получали путем разведения препарата Viscol («Имтек», Россия) с помощью растворов 0,1 N NaOH и 10x среды культивирования. Суспензию клеток (фибробластов и миофибробластов) смешивали с готовым коллагеновым гелем (из расчета 2×10^5 клеток на 1 мл геля-носителя) и высевали по 250 мкл на лунку в 48-луночный планшет («Corning», США). После полимеризации геля в каждую лунку добавляли по 0,5 мл среды, и культивировали при 37°C, 5% CO₂. Через 72 ч фиксировали изменение площади геля, отражающую сократительную способность клеток.

Исследование уровня апоптоза миофибробластов. Исследование выраженности апоптоза миофибробластов на срезах сердец ложнопериованных и ПСА мышей проводили с помощью TUNEL in situ cell apoptosis kit в соответствии с рекомендациями изготовителя набора («Rosch», США). Для оценки апоптоза миофибробластов после воздействия стауроспорина (50 нМ) и стауроспорина в комбинации с рапамицином (10 мкМ) *in vitro* использовали проточную цитофлуориметрию в комбинации с двойным окрашиванием аннексином V и пропидий йодидом в соответствии с инструкциями производителя набора

(«BD Pharmingen», США). Прикрепленные клетки собирали раствором трипсина-ЭДТА, объединяли с открепленными клетками, промывали в ФСБ и ресуспендировали в буфере для связывания. Далее, добавляли аннексин V и пропидий йодид, и смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин перед анализом. Анализ проводили с помощью проточной цитометрии с использованием BD FACS Aria III («BD Pharmingen», США). Количество аннексин V+ апоптотических клеток определяли в процентах от всей популяции.

Микроскопия и анализ изображений. Анализ клеток и криосрезов миокарда проводили с использованием флуоресцентного микроскопа Axiovert 200 M («Carl Zeiss», США) и программного обеспечения AxioVision 4.8 («Carl Zeiss», США).

Статистический анализ. Данные представили в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение ($M \pm SD$). Данные анализировали статистически с помощью программы GraphPad Prism (GraphPad Software 8.3.0). Нормальность распределения проверяли с использованием критерия Шапиро-Уилка. Данные *in vivo* исследований сравнивали статистически с использованием *t*-критерия Стьюдента. Данные *in vitro* исследований — с помощью одномерного дисперсионного анализа ANOVA с поправкой Уэлча, для межгрупповых попарных сравнений использовали тест множественных сравнений Холма-Седака. Различия считали статистически значимыми при значениях $p < 0,05$.

Результаты

Для оценки активности апоптоза в фибробластах сердца проводили моделирование *in vivo* сердечного фиброза, вызванного перегрузкой сердца давлением. Выживаемость животных на 30-й день наблюдения после проведения операции ПСА составила 14%. После ПСА поздние послеоперационные осложнения, связанные с инфекцией, у животных не развивались. Обнаружили, что через 30 дней после ПСА у животных развились признаки гипертрофии ЛЖ, а также выраженного интерстициального и периваскулярного фиброза, детектируемого с помощью окрашиваний срезов пикросириусом красным (рис. 1, *a, b*). Исследование уровня выраженности апоптоза с помощью Tunel assay показало, что лишь единичные клетки в интерстиции имели позитивное окрашивание, указывающее на запуск механизмов их гибели (рис. 1, *c*). При этом общее количество Tunel+ клеток в интерстиции сердец животных ложнопериованных и ПСА групп не отличались (рис. 1, *d*). Таким образом, формирование фиброза в сердце характеризовалось низкими показателями гибели фибробластов/миофибробластов.

Для уточнения механизмов устойчивости миофибробластов к апоптозу получили культуру

миофибробластов путем воздействия профибротическим цитокином TGF β 1 на первичные сердечные фибробласты. Обработка TGF- β приводила к изменению морфологии кардиальных ФБ: происходило увеличение размеров веретенообразных клеток и формирование сети стресс волокон на основе полимеризованных актиновых микрофиламентов (рис. 2, *a, b*). В состав стресс-фибрилл включались волокна гладкомышечного α -актина, что указывало на перестройку цитоскелета и приобретением клетками сократительного фенотипа (рис. 2, *b*). Действительно, обработка клеток профибротическим индуктором TGF β 1 приводила к генерации сил натяжения цитоскелета, которые вызвали сокращение геля, сформированного коллагеном (рис. 2, *c, d*). Таким образом, обработка клеток TGF β 1 приводила к изменению морфологии клеток, реорганизации цитоскелета с формированием разветвленной сети стресс-фибрилл, повышением экспрессии гладкомышечного альфа-актина, коллагена 1 и приобретением сократительной способности, что указывает на их дифференцировку в направлении миофибробластов (рис. 2, *b*).

Для изучения механизма элиминации миофибробластов разработали клеточную модель *in vitro*, основанную на культивировании клеток в присутствии стауроспорина. Обнаружили, что уже через 6 ч после обработки миофибробластов стауроспорином появляются округлые клетки с признаками конденсации хроматина (рис. 3). Для подтверждения индукции гибели клеток после добавления стауроспорина провели исследования с помощью иммуноблоттинга и обнаружили образование расщепленной каспазы 3, что указывает на активацию внутреннего сигнального пути апоптоза (рис. 3, *d*). Кроме того, обнаружили, что вышеуказанные проявления сопровождались накоплением аутофагосом, детектируемых с помощью специ-

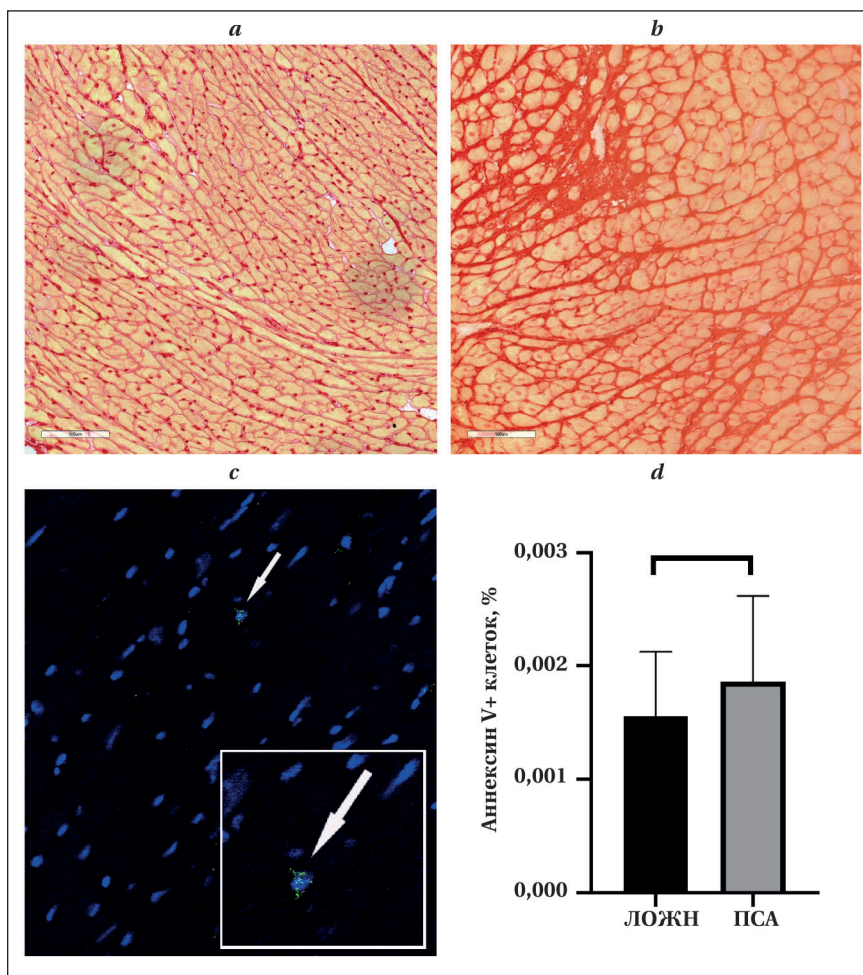


Рис. 1. Развитие сердечного фиброза характеризовалось низкими показателями апоптоза фибробластов/миофибробластов.

Примечание. Репрезентативные изображения срезов сердца ложнооперированных мышей (*a*) и животных после ПСА (*b*). Окраска пикросириусом красным. Коллагены детектированы красным цветом. Репрезентативные изображения детекции аннексин V+ клеток (зеленый в поле квадрата), отражающие их вступление в апоптоз, в сердце мыши после моделирования ПСА (*c*). Ядра клеток окрашены DAPI. Стрелка указывает на аннексин V+ клетку. *d* — график количественной оценки содержания аннексин V+ клеток в ложнооперированных и ПСА сердцах. Статистический анализ провели с помощью *t*-критерия Стьюдента; $p=0,32$, $n=10$).

фического красителя CytoID и признаками активации машинерии аутофагии (повышения соотношения LC3II/LC3I и деградацией p62/SQSTM1) (рис. 3, *e–d*). Через сутки после воздействия стауроспорина CytoID+ вакуоли аккумулировались в большинстве апоптотических клеток, что указывало на наличие связи гибели клеток с аутофагией.

Далее, решили проверить насколько воздействие рапамицина, вызывающего повышение активности аутофагии, может влиять на уровень апоптоза миофибробластов, индуцированную стауроспорином. Установили, что культивирование клеток в присутствии рапамицина не оказывало влияния на жизнеспособность миофибробластов. Между тем, его совместное использование с стауроспорином обеспечивало усиление гибели клеток, что акцен-

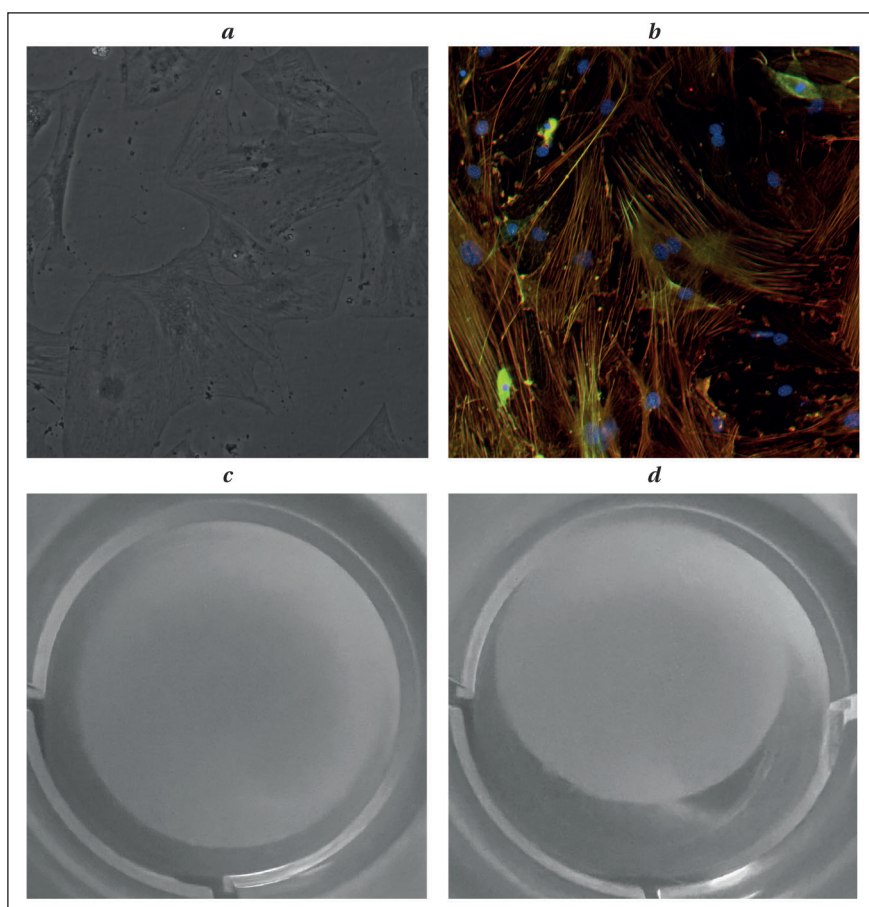


Рис. 2. Характеристика миофибробластов сердца мыши.

Примечание. *a* — репрезентативные изображения миофибробластов сердца мыши (фазовый контраст). *b* — репрезентативные изображения иммунофлуоресцентного окрашивания миофибробластов антителами к гладкомышечному альфа-актину (зеленый) и фаллоидину (красный); желтый указывает на колокализацию сигнала гладкомышечного альфа-актина и фаллоидина. *c, d* — репрезентативные изображения сокращения коллагенового геля, содержащего фибробласты (*c*) и миофибробласты (*d*).

тировало важную роль повышенной активности аутофагии в качестве триггера апоптоза (контроль $1,68 \pm 0,66\%$ ($n=4$); стауроспорин $65,8 \pm 2,63\%$ ($n=4$); рапамицин+стауроспорин $73,73 \pm 0,67\%$ ($n=4$); контроль vs стауроспорин $p < 0,0001$; контроль vs рапамицин+стауроспорин $p < 0,0001$; стауроспорин vs рапамицин+стауроспорин $p = 0,0071$) (рис. 3, *e*).

Обсуждение

В настоящее время накоплена убедительная доказательная база, позволяющая рассматривать миофибробласты как ключевые клетки, ответственные за чрезмерный синтез, отложение и ремоделирование белков внеклеточного матрикса при сердечном фиброзе [7–10]. Несмотря на определенные успехи в идентификации биологических индукторов и понимании основ дифференцировки фибробластов в направлении миофибробластов, точные механизмы, помогающие миофибробластам сохраняться в фиброзных тканях, остаются малоизученными.

В рамках данного исследования показали, что перегрузка сердца давлением вызывает накопление миофибробластов, характеризующихся низким показателем их гибели по каспаз-зависимому механизму, и развитием выраженного периваскулярного и интерстициального фиброза в миокарде. Для изучения механизма элиминации миофибробластов разработали клеточную модель *in vitro*. В ее основе лежит использование стауроспорина – алкалоида, который способен инициировать апоптоз в культуре сердечных миофибробластов через каспазозависимые и каспазозависимые механизмы [21–23]. Обнаружили, что рапамицин способен усиливать эффект стауроспорина и вызывать повышенную гибель миофибробластов за счет аутофагия-ассоциированных механизмов.

Аутофагия — эволюционно консервативный процесс, который участвует в поддержании гомеостатического баланса между син-

тезом, деградацией и рециркуляцией органелл, белков для удовлетворения метаболических потребностей и регуляции клеточных функций [24–26]. В качестве адаптивной реакции аутофагия способна облегчить стрессовые состояния, такие как гипоксия, окислительный стресс, голодание, стресс эндоплазматического ретикулума и т. д. [27]. На ранних этапах она является цитопротективной, однако ее длительная активация может привести к дисфункции клеточных органелл, запуску апоптотического каскада и гибели клеток (программируемая гибель клеток II типа) [28, 29]. Среди сенсоров, регулирующих аутофагию, ведущую роль отводят серин/треониновой протеинкиназе mTOR (mammalian target of rapamycin) [30].

В условиях обеспеченности питательными веществами она обладает способностью ингибировать инициаторный комплекс формирования аутофагосом ULK (комплекс Unc-51-подобной киназы 1 (ULK)), а также вовлечена в регуляцию транскрипции генов, связанных с ауто-

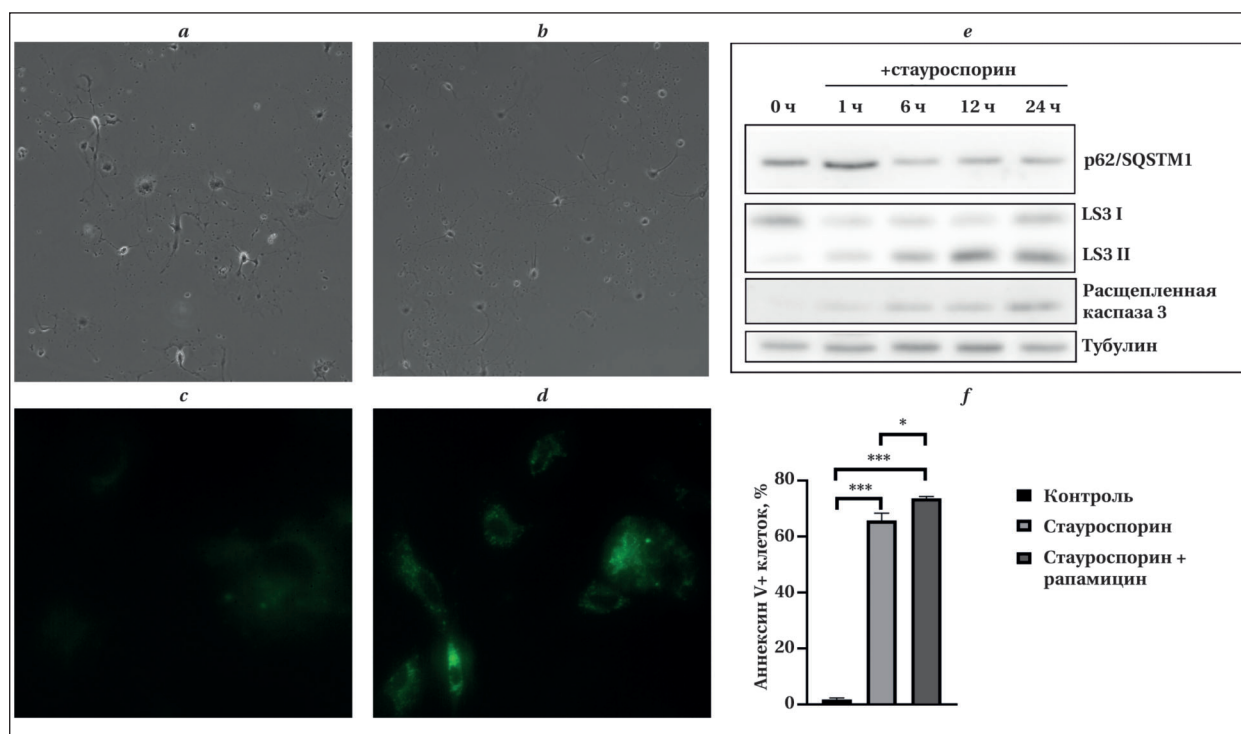


Рис. 3. Стауроспорин активировал аутофагию и вызывал гибель миофибробластов.

Примечание. *a, b* — репрезентативные изображения миофибробластов (фазовый контраст); *a* — после обработки стауроспорином (50 нМ, 24 ч); *b* — после обработки стауроспорином (50 нМ, 24 ч) в комбинации с рапамицином (10 мкМ, 24 ч). *c, d* — репрезентативные изображения Cyto-ID+аутофагосом (зеленый); *c* — в контрольных миофибробластах; *d* — после обработки стауроспорином. *e* — репрезентативные изображения мембран, окрашенных антителами к p62/SQSTM1, LC3 I, LC3 II, расщепленной каспазе 3 и тубулину, отражающих экспрессию белков в контрольных миофибробластах и обработанных стауроспорином (50 нМ, 1, 6, 12 и 24 ч). *f* — график количественной оценки уровня апоптоза в контрольной культуре миофибробластов, клетках после обработки стауроспорином и стауроспорином в комбинации с рапамицином в течение 24 ч. Статистический анализ провели с помощью дисперсионного анализа ANOVA с поправкой Уэлча (***) — $p < 0,0001$; * — $p = 0,0071$; $n = 4$ в каждой группе).

фагией. mTOR1 может фосфорилировать транскрипционный фактор TFEB, предотвращая его ядерную транслокацию и транскрипцию ряда генов, связанных с аутофагией [31–35].

Проведенные нами исследования показали, что развитие сердечного фиброза, вызванное перегрузкой сердца давлением, характеризуется снижением уровня активности аутофагии в сердечной ткани. Детальные биоинформатические исследования транскриптома единичных клеток позволили выяснить, что при развитии сердечной дисфункции отсутствуют изменения экспрессии генов, ассоциированных с аутофагией, в тотальном пуле сердечных фибробластов и отдельных его субпопуляциях [12].

Это может быть объяснено сохранением высокого уровня активности комплекса mTOR, который ответственен за снижение внутриклеточной деградации коллагенов путем аутофагии, приобретением устойчивости клеток к апоптозу и определяет их нарушенную способность адаптироваться к стрессу [36]. Для проверки этой гипотезы мы провели эксперименты *in vitro* с использованием индуктора апоптоза — стауроспорина. Первоначально это

соединение было получено из *Streptomyces* и характеризовалось способностью ингибировать протеинкиназу C [37]. Однако впоследствии было выяснено, что оно является неизбирательным ингибитором целого ряда различных киназ [38, 39], что обеспечивает его способность инициировать апоптоз в большинстве клеток млекопитающих.

В нашем исследовании обнаружили, что обработка клеток стауроспорином инициировала гибель миофибробластов, обеспечивала одновременное увеличение количества аутофагосом и изменение экспрессии белков (увеличение соотношения LC3II/LC3I и деградацией p62/SQSTM1), ассоциированных с повышением активности аутофагии. Определенным объяснением стауроспорин-индуцированного повышения аутофагии может служить изменение активности mTOR и фосфорилирования нижележащих регуляторных элементов трансляции [40]. К ним относится киназа p70 S6, которая фосфорилирует рибосомальный белок S6 и эукариотический фактор инициации (eIF)4E.

Воздействие стауроспорина приводило к снижению активности киназы p70 S6, дефосфори-

лированию рибосомального белка S6, увеличению связывания 4E-BP1 с eIF4E и одновременному уменьшению количества комплексов eIF4E. Таким образом, нарушение сигнализации mTOR под действием стауроспорина инициирует ранний клеточный ответ (до активации каскада каспаз) на воздействие стрессового стимула, в том числе реализуемый за счет активации аутофагии, и определяет готовность к инициации апоптоза.

Далее, проверили как дополнительная стимуляция аутофагии, может воздействовать на уровень апоптоза в миофибробластах, индуцированного стауроспорином. Для этого мы использовали рапамицин (сиролимус), который является антибиотиком/иммунодепрессантом, продуцируемым почвенными бактериями *Streptomyces hygroscopicus*, и который, за счет воздействия на свою молекулярную мишень киназу mTOR (mammalian target of rapamycin), вызывает индукцию аутофагии [24]. По нашим данным применение рапамицина значительно усили-

вало проапоптотическое действие стауроспорина, что могло быть связано с более выраженным и устойчивым ингибированием сигнализации mTOR [41, 42].

Заключение

Таким образом, перегрузка сердца давлением вызывает накопление миофибробластов, характеризующихся низким показателем апоптоза, и развитием выраженного интерстициального фиброза в миокарде. Для изучения механизма элиминации миофибробластов разработали клеточную модель с использованием стауроспорина — алкалоида, который способен инициировать апоптоз в культуре сердечных миофибробластов. Обнаружили, что рапамицин способен усиливать эффект стауроспорина и вызывать повышенную гибель миофибробластов за счет аутофагия-ассоциированных механизмов. Молекулярные механизмы этого процесса требуют дополнительных исследований.

Литература

- Henderson N. C., Rieder E., Wynn T. A. Fibrosis: from mechanisms to medicines. *Nature*. 2020; 587 (7835): 555–566.
- Mensah G. A., Fuster V., Murray C. J. L., Roth G. A. Global burden of cardiovascular diseases and risks, 1990–2022. *J Am College Cardiol*. 2023; 82 (25): 2350–2473. DOI: 10.1016/j.jacc.2023.11.007. PMID: 38092509.
- Bruder O., Wagner A., Jensen C. J., Schneider S., Ong P., Kispert E. -M., Nassestein K., et al. Myocardial scar visualized by cardiovascular magnetic resonance imaging predicts major adverse events in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2010; 56 (11): 875–87. DOI: 10.1016/j.jacc.2010.05.007. PMID: 20667520.
- O'Hanlon R., Grasso A., Roughton M., Moon J. C., Clark S., Wage R., Webb J., et al. Prognostic significance of myocardial fibrosis in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2010; 56 (11): 867–874. DOI: 10.1016/j.jacc.2010.05.010. PMID: 20688032.
- Harris K. M., Spirito P., Maron M. S., Zenovich A. G., Formisano E., Lesser J. R., Mackey-Bojack S., et al. Prevalence, clinical profile, and significance of left ventricular remodeling in the end-stage phase of hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 2006; 114 (3): 216–225. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.583500. PMID: 16831987.
- Poddi S., Lefter C. L., Linardi D., Ardigò A., Luciani G. B., Rungtatscher A. Myocardial fibrosis: assessment, quantification, prognostic significance, and anti-fibrosis targets: a state-of-the-art review. *J Cardiovasc Dev Dis*. 2025; 12 (5): 192. DOI: 10.3390/jcdd12050192. PMID: 40422963.
- Leask A. TGF β , cardiac fibroblasts, and the fibrotic response. *Cardiovasc Res*. 2007; 74 (2): 207–212. DOI: PMID: 16919613.
- Hinz B., Phan S. H., Thannickal V. J., Galli A., Bochaton-Piallat M. L., Gabbiani G. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol*. 2007; 170 (6): 1807–16. DOI: 10.2353/ajpath.2007.070112. PMID: 17525249.
- Krenning G., Zeisberg E. M., Kalluri R. The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis. *J Cell Physiol*. 2010; 225(3): 631–7. DOI: 10.1002/jcp.22322. PMID: 20635395.
- Lin H., Wang X., Chung M., Cai S., Pan Y. Direct fibroblast reprogramming: an emerging strategy for treating organic fibrosis. *J Transl Med*. 2025; 23 (1): 240. DOI: 10.1186/s12967-024-06060-3. PMID: 40016790.
- Eissa L. A., Marawan A. M., Marawan M. E., Abass S. A. Autophagy in disease management: Exploring the potential of natural products as targeted therapies. *Pathol Res Pract*. 2025; 272: 156077. DOI: 10.1016/j.prp.2025.156077. PMID: 40516139.
- Дергилев К. В., Гольцева Ю. Д., Поколаева З. И., Белоглазова И. Б., Ярушккина И. С., Азимова Е. Д., Ратнер Е. И., и др. Активность аутофагии в фибробластах сердца на ранних этапах развития сердечной дисфункции, вызванной перегрузкой давлением. *Кардиологический вестник*. 2025; 20 (1): 13–21. Dergilev K. V., Goltseva Yu. D., Tsokolayeva Z. I., Beloglazova I. B., Yarushkina I. S., Azimova E. D., Ratner E. I., et al. Autophagy activity in cardiac fibroblasts in the early stages of cardiac dysfunction induced by pressure overload. *Russian Cardiology Bulletin=Kardiologicheskii Vestnik*. 2025; 20 (1): 13–21. (in Russ.). DOI: 10.17116/Cardiobulletin20252001113.
- Ma J., Tan X., Feng J., Li Z., Tan S., Li B., Zhao L. Research progress on the regulation of autophagy in cardiovascular diseases by chemokines. *Open Life Sci*. 2025; 20 (1): 20221026. DOI: 10.1515/biol-2022-1026. PMID: 40535169.
- Dergilev K. V., Makarevich P. I., Tsokolaeva Z. I., Boldyreva M. A., Beloglazova I. B., Zubkova E. S., Menshikov M. Y., et al. Comparison of cardiac stem cell sheets detached by Versene solution and from thermoresponsive dishes reveals similar properties of constructs. *Tissue and Cell*. 2017; 49 (1): 64–71. DOI: 10.1016/j.tice.2016.12.001. PMID: 28041835.
- Dergilev K. V., Shevchenko E. K., Tsokolaeva Z. I., Beloglazova I. B., Zubkova E. S., Boldyreva M. A., Menshikov M. Y., et al. Cell sheet comprised of mesenchymal stromal cells overexpressing stem cell factor promotes epicardium activation and heart function improvement in a rat model of myocardium infarction. *Int J Mol Sci*. 2020; 21 (24): 9603. DOI: 10.3390/ijms21249603. PMID: 33339427.
- Mukade Y., Kobayashi S., Nishijima Y., Kimura K., Watanabe A., Ikota H., Shirabe K., et al. Phosphotungstic acid-treated picrosirius red staining improves whole-slide quantitative analysis of collagen in histological specimens. *J Histochem Cytochem*. 2023; 71 (1): 11–26. DOI: 10.1369/00221554221141140. PMID: 36433833.
- Hu X.-J., Wu W.-C.-H., Dong N.-G., Shi J.-W., Liu J.-W., Chen S., Deng C., et al. Role of TGF- β 1 signaling in heart valve calcification induced by abnormal mechanical stimulation in a tissue engineering model. *Curr Med Sci*. 2018; 38 (5): 765–75. DOI: 10.1007/s11596-018-1943-9. PMID: 30341511.
- Bernacchioni C., Capezzuoli T., Vannuzzi V., Malentacchi E., Castiglione F., Cencetti E., Ceccaroni M., et al. Sphingosine 1-phosphate receptors are dysregulated in endometriosis: possible implication in transforming growth factor β -induced fibrosis. *Fertil Steril*. 2021; 115 (2): 501–511. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2020.08.012. PMID: 32907751.
- Wenner C. E., Yan S. Biphasic role of TGF- β 1 in signal transduction and crosstalk. *J Cell Physiol*. 2003; 196 (1): 42–50. DOI: 10.1002/jcp.10243. PMID: 12767039.
- Guo S., Liang Y., Murphy S. F., Huang A., Shen H., Kelly D. F., Sobrado P., et al. A rapid and high content assay that measures cyto-ID-stained autophagic compartments and estimates autophagy flux with potential clinical applications. *Autophagy*. 2015; 11 (3): 560–572. DOI: 10.1080/15548627.2015.1017181. PMID: 25714620.
- Brokowska J., Gaffke L., Pierzynowska K., Węgrzyn G. Enhanced efficiency of the basal and induced apoptosis process in mu-

- copolysaccharidosis IVA and IVB human fibroblasts. *Int J Mol Sci.* 2023; 24 (18): 14119. DOI: 10.3390/ijms241814119. PMID: 37762422.
22. Gui Y, Lu Q, Gu M, Wang M, Liang Y, Zhu X, Xue X, et al. Fibroblast mTOR/PPAR γ /HGF axis protects against tubular cell death and acute kidney injury. *Cell Death Differ.* 2019; 26 (12): 2774–89. DOI: 10.1038/s41418-019-0336-3. PMID: 31024074.
 23. Sarkar R, Choudhury S. M., Kanneganti T. D. Classical apoptotic stimulus, staurosporine, induces lytic inflammatory cell death, PANoptosis. *J Biol Chem.* 2024; 300 (9): 107676. DOI: 10.1016/j.jbc.2024.107676. PMID: 39151726.
 24. Schmelzle T, Hall M. N. TOR, a central controller of cell growth. *Cell.* 2000; 103 (2): 253–262. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)00117-3. PMID: 11057898.
 25. Дергилев К. В., Цоколаева З. И., Гуреенков А. Д., Расулова М. Т., Парфенова Е. В. Активность аутофагии в клетках эпикарда при развитии острого перикардита. *Общая реаниматология.* 2024; 20 (1): 43–49. Dergilev K. V., Tsokolayeva Z. I., Gureyevkov A. D., Rasulova M. T., Parfenova E. V. Autophagy activity in epicardial cells in acute pericarditis. *General Reanimatology=Obshchaya Reanimatologiya.* 2024; 20(1): 43–49. (in Russ.&Eng.). DOI: 10.15360/1813-9779-2024-2366
 26. Luo Q, Zhao Y, Ren P, Liu X, Chen Y, Ying Q, Zhou J. Autophagy — unlocking new dimensions in the pathology and treatment of depression. *Cell.* 2025; 14 (11): 795. DOI: 10.3390/cells14110795. PMID: 40497971.
 27. He C., Klionsky D. J. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet.* 2009; 43 (1): 67–93. DOI: 10.1146/annurev-genet-102808-114910. PMID: 19653858.
 28. Nah J., Zablocki D., Sadoshima J. The role of autophagic cell death in cardiac disease. *J Mol Cell Cardiol.* 2022; 173: 16–24. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2022.08.362. PMID: 36084743.
 29. Yang X, Wu H., Zhou G., Zhang D., Yang Q., Liu Y. Autosis: a new form of cell death in myocardial ischemia–reperfusion injury. *Mol Cell Biochem.* 2025; 480 (1): 91–101. DOI: 10.1007/s11010-024-04988-0. PMID: 38594455.
 30. Ritter L. M., Annear N. M. P., Baple E. L., Ben-Chaabane L. Y., Bodi I., Brosson L., Cadogan J. E., et al. mTOR pathway diseases: challenges and opportunities from bench to bedside and the mTOR node. *Orphanet J Rare Dis.* 2025; 20 (1): 256. DOI: 10.1186/s13023-025-03740-1. PMID: 40426219.
 31. Kim J., Kundu M., Viollet B., Guan K.-L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol.* 2011; 13 (2): 132–41. DOI: 10.1038/ncb2152. PMID: 21258367.
 32. Egan D., Kim J., Shaw R. J., Guan K.-L. The autophagy initiating kinase ULK1 is regulated via opposing phosphorylation by AMPK and mTOR. *Autophagy.* 2011; 7 (6): 643–644. DOI: 10.4161/auto.7.6.15123. PMID: 21460621.
 33. Martina J. A., Chen Y., Gucek M., Puertollano R. MTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB. *Autophagy.* 2012; 8 (6): 903–914. DOI: 10.4161/auto.19653. PMID: 22576015.
 34. Sardiello M., Palmieri M., Di Ronza A., Medina D. L., Valenza M., Gennarino V. A., Malta C. D., et al. A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science.* 2009; 325 (5939): 473–477. DOI: 10.1126/science.1174447. PMID: 19556463.
 35. Settembre C., Ballabio A. TFEB regulates autophagy: an integrated coordination of cellular degradation and recycling processes. *Autophagy.* 2011; 7 (11): 1379–81. DOI: 10.4161/auto.7.11.17166. PMID: 21785263.
 36. Heitman J. On the discovery of TOR as the target of rapamycin. *PLoS Pathog.* 2015; 11 (11): e1005245. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005245. PMID: 26540102.
 37. Zhao W.-J., Qian Y., Zhang Y.-E., Yang A.-H., Cao J.-X., Qian H.-Y., Liu Y., et al. Endothelial FOSL1 drives angiotensin II-induced myocardial injury via AT1R-upregulated MYH9. *Acta Pharmacol Sin.* 2025; 46 (4): 922–939. DOI: 10.1038/s41401-024-01410-9. PMID: 39592734.
 38. Rüegg U. T., Gillian B. Staurosporine, K-252 and UCN-01: potent but nonspecific inhibitors of protein kinases. *Trends Pharmacol Sci.* 1989; 10(6): 218–220. DOI: 10.1016/0165-6147(89)90263-0. PMID: 2672462.
 39. Meggio E., Deana A. D., Ruzzene M., Brunati A. M., Cesaro L., Guerra B., Meyer T., et al. Different susceptibility of protein kinases to staurosporine inhibition: kinetic studies and molecular bases for the resistance of protein kinase CK2. *Europ J Biochem.* 1995; 234 (1): 317–322. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1995.317_c.x. PMID: 8529658.
 40. Tee A. R., Proud C. G. Staurosporine inhibits phosphorylation of translational regulators linked to mTOR. *Cell Death Differ.* 2001; 8 (8): 841–849. DOI: 10.1038/sj.cdd.4400876. PMID: 11526437.
 41. Yi Z., Liu J., Shen L., Hu Y. mTOR and autophagy in acute lung injury pathogenesis and therapeutic potential. *J Thorac Dis.* 2025; 17 (4): 2679–92. DOI: 10.21037/jtd-24-1817. PMID: 40400934.
 42. Fu W., Wu G. Targeting mTOR for anti-aging and anti-cancer therapy. *Molecules.* 2023; 28 (7): 3157. DOI: 10.3390/molecules28073157. PMID: 37049920.

Поступила 24.06.2025

Принята 20.11.2025